جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقاله پژوهشی

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف گیاه Artemisia Annua اطراف شهر بابل

دکتر محمود برادران [۱]، ***دکتر منوچهر اشرف پور*** [۱،۲]*، ، ***حکیمه رضایی*** [۳]، ***دکتر علی اصغر سفیدگر*** [۴]، ***حمزه شریفی*** [۵]

[۱] استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

[۲] مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، استادیار گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

[۳] کارشناس ارشد علوم گیاهی، آموزش و پرورش شهرستان بابل

[۴] دانشیار گروه قارچ شناسی و انگل شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

[۵] مربی گروه زبان دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی بابل

نشانی نویسنده مسؤول: بابل، دانشگاه علوم پزشکی بابل، دانشکده پزشکی، گروه فیزیولوژی و فارماکولوژی، دکتر منوچهر اشرف پور
E-mail: mnrashrafpour@yahoo.com

وصول:۹۳/۲/۳، اصلاح:۹۳/۴/۲۲، پذیرش:۹۳/۵/۱

چکیده

زمینه و هدف: گیاهان، منبع مهمی برای آنتی‌اکسیدان‌ها هستند که استفاده‌ی از آن‌ها، می‌تواند به جلوگیری از تجمع رادیکال‌های آزاد به متابولیسم طبیعی سلول‌ها کمک‌کرده و از بیماری‌های مربوط به استرس اکسیداتیو جلوگیری‌کند. بنابراین مطالعه‌ی حاضر، با هدف تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف Artemissia Annua(A.A) انجام شده است.

مواد و روش‌ها: با شناسایی گیاه A.A که با نام محلی «گندواش» خوانده می‌شود، بخش‌های برگ و گل گیاه را به‌صورت پودر درآورده و عصاره‌گیری با حلال‌های آبی، اتانولی و متانولی صورت‌گرفت. تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP انجام‌شد. برای این منظور، محلول‌های ۲۰٪ عصاره به محلول FRAP اضافه‌شده و پس از انکوبه‌نمودن میزان جذب نوری اندازه‌گیری‌شد. محلول‌های سولفات آهن و ویتامین C به‌عنوان استاندارد مورد استفاده قرارگرفتند.

یافته‌ها: متوسط ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل(TAC) عصاره‌ی متانولی برگ ۴/۱۸ ±۷۲/۱۸ میکرومول فروس سولفات و ۵/۲۷±۹۰/۳۱میلی‌گرم ویتامین C به‌ازای هر گرم از وزن خشک بود که به‌طور قابل ملاحظه‌ای، بالاتر از سایر عصاره‌ها می‌باشد($p<0.001$). عصاره‌ی اتانولی برگ و نیز عصاره‌ی متانولی گل از نظر TAC ازنظراهمّیّت، در مرحله‌ی بعدی قرارداشتند. مقایسه‌ی TAC عصاره‌های آبی برگ و گل ازنظر آماری معنادار نبود ($p>0.05$) ولی عصاره‌های اتانولی برگ و گل تفاوت آماری معناداری نشان‌دادند ($p<0.01$).

نتیجه‌گیری: عصاره‌های مختلف A.A، دارای TAC متفاوتی هستند که این اختلاف می‌تواند به‌تفاوت در کارآیی حلال‌های مختلف در استخراج مواد آنتی‌اکسیدان گیاه مربوط باشد. به‌نظرمی‌رسد متانول حلال بهتری از اتانول و آب برای استخراج مواد آنتی‌اکسیدان این گیاه باشد و یافته‌های مربوط به *TAC* عصاره‌های متانولی برگ و گل نشان می‌دهند که احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدان در برگ‌های A.A بیشتر توزیع‌شده‌اند.

واژه‌های کلیدی: *Artemissia Annua، آنتی‌اکسیدان، ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل، عصاره‌گیری.*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه

اشکال متنوعی از رادیکال‌های آزاد که به‌طور مداوم در طی روندهای متابولیسمی تولیدمی‌شوند، توسط شبکه‌ی آنتی‌اکسیدانی بدن خنثی می‌گردند و چنانچه ایجاد این مواد ازظرفیّت مکانیسم‌های آنتی‌اکسیدانی بدن فراتر برود، سبب آسیب اکسیداتیو بافت‌ها و مولکول‌های زیستی و درنهایت موجب بروز بیماری خواهدشد(۱). رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های واکنشی هستند که دربسیاری از روندهای فیزیولوژیکی و نیز بیماری‌های گوناگون درگیرهستند (۲). آسیب اکسیداتیو درایجاد طیفی از اختلالات و بیماری‌ها مانند بیماری‌های قلبی، کانسر، آرتریت، عوارض سالمندی، اختلالات نورودژنراتیو مثل پارکینسون، الکلیسم، واکنش‌های ناشی از سموم و آسیب کبدی نقش‌دارد (۱و۳). آنتی‌اکسیدان به ماده‌ای اطلاق‌می‌شود که درمقایسه با یک ماده‌ی اکسیدان، واکنش اکسیداسیون را به‌طور معناداری به‌تاخیر انداخته و یا مهارمی‌نماید (٤). بنابراین ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌عنوان عوامل محافظت‌کننده، نقش مهمی در حفظ سلامت ایفا‌می‌کنند. شواهد نشان‌می‌دهند که آنتی‌اکسیدانها، خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن، سرطان و بیماری‌های قلبی را کاهش‌می‌دهند. گیاهان از جمله منابع اولیه‌ی آنتی‌اکسیدان‌ها به‌شمارمی روند. ویتامین‌های C و E، کاروتن ها، ترکیبات فنلی، فیتات‌ها و فیتواستروژن‌ها از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با منشأ گیاهی وغذایی هستند که همگی به‌طور بالقوه‌ای، خطر بروز بیماری‌ها را کاهش‌می‌دهند. بخش عمده‌ی ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی مشتق می‌شوند که به‌لحاظ ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی متفاوت‌هستند. اگرچه مونوفنل‌ها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های ضعیف عمل‌می‌کنند، اما برخی ازآنها مانند گالات‌ها، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی هستند.(۳، ٤و ٥). از میان ترکیبات آنتی‌اکسیدان، فنل‌ها توزیع گسترده‌ای دربسیاری از گیاهان دارند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی، عمدتاً ناشی از قدرت احیاءکنندگی و ساختار شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به‌خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و تشکیل کمپلکس‌های یونی می‌سازد. ترکیبات فنلی ازطریق اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد، واکنش‌های اکسیداسیون چربی را مهارمی‌کنند (٥).

گیاهان، منبع بالقوه‌ی مهمی برای آنتی‌اکسیدان‌ها هستند. درهمین رابطه گفته‌شده‌است که بخش‌های مختلف گیاه AA مثل برگ‌ها، گل، ساقه و ریشه‌های آن حاوی انواع مختلفی از مواد و متابولیت‌های با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه هستند (٦). Artemissia Annua (A.A) گیاهی است ازخانواده‌ی Asteraceae که بیش از۳۰۰ گونه از آن معرفی شده‌است (۷ و ۸). گزارش‌های متعددی وجوددارند که نشان‌می‌دهند A.A در طب سنتی کشورهای مختلف برای درمان طیفی از بیماری‌ها از جمله مالاریا (۹)، عفونت‌ها و بیماری‌های التهابی (۸ و ۹) ، زخم معده و کانسر (۱۰) به‌کارمی‌رود (۱۱و ۱۲). یافته‌های برخی مطالعات نشان‌داده‌اند که A.A حاوی غلظت بالای انواعی از مواد بیولوژیکی فعال مانند Cineole، a-Pinene، Comphene، Borneol، Comphor، Germacrone-D و Artemisia ketone است (۸ و ۱۳). همچنین ترکیبات فنلی مختلفی در AA وجوددارند، ولی فلاونوئیدها و هیدروکسی سینامایت‌ها از ترکیبات فنلی اصلی هستند که در آن وجوددارند (۸). عوامل دارای فلاونوئیدهای بالا و نیز انواع زیادی از سایر ترکیبات، دارای ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی هستند (٦ و ١٤).

ترکیبات آنتی‌اکسیدان موجود در گیاهان، بسیار متنوع‌بوده و اثرات و قابلیّت استخراج آنها، شدیداً به‌ساختار شیمیایی آنها وابسته است. به‌گونه‌ای که با تغییر شرایط استخراج مثل حلالهای به‌کاررفته، فعالیّت آنتی‌اکسیدانی آنها نیز تغییرمی‌یابد (۹ و ۱۵).روش استخراج و عصاره‌گیری و نیز نوع حلال‌های به‌کاررفته، نقش مهمی در تعیین محتوای پلی‌فنول‌ها و فلاونوئیدهای استخراجی از گیاهان ایفامی‌کند (١٦). تداخل در سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ممکن‌است توسط عوامل گوناگون ازجمله

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مواد غیرآنتی‌اکسیدان و قطبیّت حلال‌هایی که درعصاره-گیری به‌کار می‌روند، به‌وجود آید (۹).

FRAP) Ferric Reducing Antioxidant Power) روشی ساده و سریع برای تعیین فعالیت آنتی-اکسیدانی است که واکنش آن به‌صورت خطی و متناسب با غلظت مولی آنتی‌اکسیدان‌ها صورت‌می‌گیرد، ولی با بعضی ازآنتی‌اکسیدان‌ها مانند گلوتاتیون سریع واکنش نمی‌دهد (۲، ۱۷ و ۱۸). مطالعه پیرامون یافتن و تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌واسطه‌ی نقش بالقوه‌ی آنها، می‌تواند ارزشمند باشد. اگرچه یافته‌های تعدادی از مطالعات، وجود درجات متفاوتی ازخواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی برگ AA را نشان‌داده اند (٦، ٩، ١٤ و ١٦)، ولی یافته‌ها نشان‌می‌دهند که ترکیب شیمیایی و خواص بیولوژیک AA بسته به منشأ جغرافیایی و روش فرآوری و پردازش آنها شدیداً تفاوت‌دارند (۸). باتوجه به‌تفاوت خواص گیاهان بسته به موقعیت جغرافیای محل رشد آنها و نیز روش عصاره‌گیری و همچنین تفاوت در خواص بخش‌های مختلف یک گیاه، مطالعه‌ی حاضر به-منظور بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی مختلف A.A و مقایسه‌ی تاثیر وابستگی خواص آنتی‌اکسیدانی احتمالی آن با نوع حلالی که درعصاره‌گیری به‌کاربرده‌می-شود و همچنین مقایسه‌ی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره-های به‌دست‌آمده از برگ و گل AA طراحی و به اجرا درآمده‌است.

مواد و روش‌ها

مطالعه‌ی حاضر، ازنوع بنیادی بوده و مواد شیمیایی مورد نیازِانجام آن، شامل TPTZ و HCl ، اتانول و متانول از مرک و سولفات آهن (FeSO4.7H2O) بوده که از شرکت سیگما خریداری‌شده‌اند. مطالعه درطی چند مرحله، جمع‌آوری، شناسایی و خشک‌نمودن و تهیه‌ی پودر، عصاره‌گیری و تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی به اجرا درآمده‌است.

نمونه‌های اندام‌های هوایی گیاه A.A بعد ازشناسایی و تایید گیاه توسط دو نفر ازاستادان سیستماتیک گیاهی دانشگاه مازندران، از زمین‌های زراعی اطراف شهرستان بابل جمع‌آوری‌شده‌است. جمع‌آوری گیاه موردنظر درماه-های خرداد و مهر (مرحله‌ی گل‌دهی) صورت‌گرفت. نمونه‌های جمع‌آوری شده، چندبار با آب تمیز شسته وسپس خشک‌شده و برای این‌که عصاره‌گیری راحت‌تر و بهترانجام‌گیرد، توسط آسیاب برقی به‌صورت پودر درآمده‌است. عصاره‌گیری از پودر برگ و گل گیاه در سه مرحله‌ی مجزا و با سه حلال آبی، اتانولی و متانولی تهیه-شده‌است.

برای تهیه‌ی عصاره‌ی آبی، ۲۵گرم از پودر را در یک ارلن ریخته و حجم را با آب مقطر به ۱۰۰ سی‌سی رساندیم. خمیرحاصل‌شده را مجدداً با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل نموده و دهانه‌ی ارلن را با فویل آلومینیومی بسته و به‌مدت ٢٤ ساعت آن را روی شیکر قراردادیم. آنگاه، عصاره‌ی به‌دست‌آمده را ابتدا با گاز و سپس با کاغذ صافی صاف‌کرده‌ایم. بعد از صاف‌شدن، محلول را در پتری دیش ریخته و آن را برای تبخیر آب و خشک‌شدن کامل داخل انکوباتور۳۷ درجه قراردادیم (۱۹ و۲۰). بعد ازخشک‌شدن عصاره، دهانه‌ی ظرف بسته و برای استفاده در شرایط دور از نور و دردمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری‌شد. برای تهیه‌ی عصاره‌ی متانلی و اتانلی نیز به-روش فوق عمل‌شد، ولی به‌جای آب از اتانول ٩٦ ٪ و متانول ۸۰٪ استفاده‌گردید.

در این تحقیق، برای تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی A.A، از روش FRAP استفاده‌شده‌است (۱۷). برای این منظور، معرِّف FRAP به‌صورت روزانه و از طریق حل‌نمودن ۲/۵ میلی‌لیتر ازمحلول TPTZ ۱۰ میلی مولار (10 mM در 40 mM هیدروکلریک اسید)، ۲۵ میلی‌لیتر از بافراستات ۳۰۰ میلی مول برلیتر با PH ۳/٦ و ۲/۵ میلی‌لیتر ازمحلول ۲۰ میلی مولار فریک‌تری کلراید هگزاهیدرات (کلرورفریک) (نسبت ۱: ۱۰:۱) تهیه و

سپس انکوبه‌نمودن محلول حاصل در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد آماده‌شد (۸ و ۱۷). غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکرومول درلیتر از فریک سولفات هپتا هیدرات ($FeSO4.7H2O$) و همچنین ویتامین c با غلظت‌های ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، به‌عنوان محلول استاندارد استفاده‌شدند و منحنی‌های استاندارد مربوط رسم‌گردید (۲و ۸). منحنی‌های کالیبراسیون استاندارد به‌طورجداگانه، با استفاده از Excel رسم‌گردید. باتوجه به معادله‌ی خطی ($r2= 0.99$) که برخطی‌بودن ارتباط داده‌ها دلالت‌دارد، منحنی غلظت‌های نمونه‌های محلول استاندارد سولفت آهن و اسیدآسکوربیک، مقدار فعالیّت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) به‌صورت معادل سولفات آهن و ویتامین C بیان‌شده که دراین معادله، y جذب در طول موج 593nm و x معادل غلظت است (۲۱). مقادیر حاصل‌شده، به‌صورت میکرومول درمیلی‌لیتر از فروس سولفات و یا میلی‌گرم بر دسی‌لیتر اسیدآسکوربیک به‌ازای هرگرم از نمونه‌ی خشک منجمد پودر برگ و یا گل گیاه بیان‌شد.

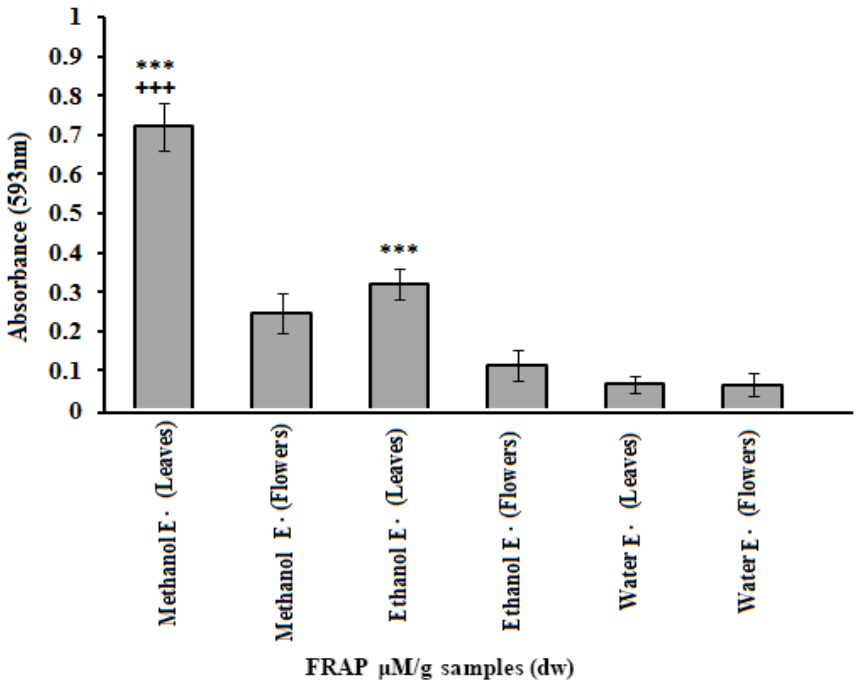
برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها درهر مرحله به هر لوله‌ی آزمایش ۱/۸ میلی‌لیتر از معرِّف FRAP ، ٤٠ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰ میکرولیتر ازعصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل اضافه‌شده و لوله‌ها به‌مدت ۱۰ دقیقه در شرایط بدون نور و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه‌شدند و درپایان، میزان جذب نوری لوله‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر درمقابل بلانک با اسپکتروفتومتر Colman Junior 35 قرائت‌شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی احیاء کننده‌ی فریک بر روی سه نمونه‌ی مجزا و برای هر نمونه سه مرتبه تکرار و میانگین عدد جذب پاسخ‌ها در مقایسه با منحنی استاندارد فریک سولفات هپتاهیدرات محاسبه و تعیین‌شد. به لوله‌های استاندارد ۵۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف محلول سولفات آهن و یا ویتامین C و به لوله‌ی بلانک ۵۰ میکرولیتر از حلال (آب مقطر، اتانول و یا متانول) اضافه‌شد.

سنجش فعالیّت آنتی‌اکسیدانی در FRAP مبتنی‌است بر انتقال الکترون و ظرفیّت احیاءکنندگی هرنمونه را نشان می‌دهد. دراین روش، یک پروب اکسیدان مثل یون فریک یک الکترون از مواد آنتی‌اکسیدان موجود در نمونه دریافت و به‌فروس تبدیل می‌شود. به‌این‌صورت که کمپلکس فریک تری پیریدیل تریازین (Fe^{III}-TPTZ) درحضور آنتی‌اکسیدان‌ها به فروس‌تری پیریدیل تریازین (Fe^{II}-TPTZ) احیاءشده و شلات حاصل از TPTZ ترکیب رنگی به‌وجودمی‌آورد که حداکثر جذب را در طول موج ۵۹۳ نانومتر نشان‌می‌دهد و مقدار آن به قدرت آنتی‌اکسیدانی احیاءکننده فریک نمونه بستگی‌دارد (۲۳،۲۲،۱۷ و ٢٤).

آنالیز آماری داده‌ها با نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ١٦ انجام‌گرفت. میانگین و انحراف معیار برای هرعصاره براساس نتایج سه آزمایش مجزا محاسبه‌شده‌اند. برای تعیین رابطه‌ی پاسخ- دوز محلول‌های استاندارد سولفات آهن و ویتامین C از آنالیز رگرسیون خطی ساده استفاده‌شد. بعد ازمحاسبه‌ی میانگین و انحراف معیار، عدد جذب در آزمایش FRAP برای مقایسه مقادیر به‌دست‌آمده از آزمون ANOVA یک‌طرفه استفاده‌شد و $p<0.05$ مبنای سطح معناداری مقایسه داده‌ها قرارگرفت.

یافته‌ها

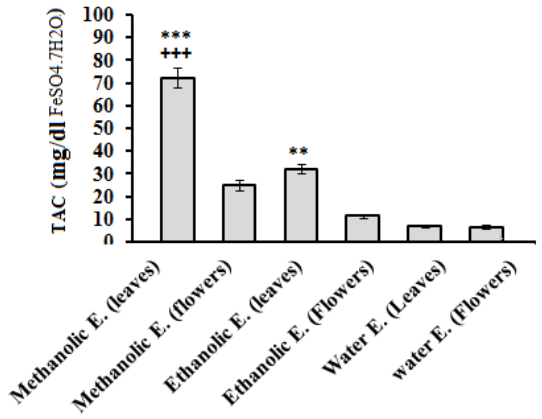
شکلِ ۱ میانگین مقدار OD اندازه گیری‌شده‌ی غلظت مساوی (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های مختلف گل و برگ A.Annua را درطول موج ۵۹۳ نانومتر نشان‌می‌دهد. دراین شکل، به‌وضوح مشخص‌است که عصاره‌های مختلف در محیط استاندارد محلول FRAP دارای عدد جذب متفاوتی هستند. برای همه حلال‌های اتانولی و متانولی برگA. Annua نسبت به گل آن عدد جذب بزرگتری نشان‌داد و نتایج آزمون ANOVA یک‌طرفه نشان می‌دهد که این تفاوت از نظر آماری معنادار

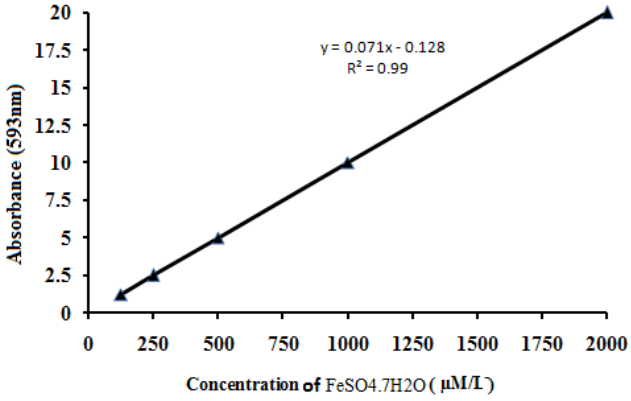


شکل۱: نمودار مقایسه‌ی عدد جذب غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر عصاره‌های مختلف درطول موج ۵۹۳ نانومتر..E= عصاره. *** معناداری تفاوت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ی متانولی برگ و گل را در سطح ($p<0.001$) ، +++ نیز معناداری مقایسه‌ی عصاره متانولی برگ و عصاره‌ی اتانولی برگ را در سطح ($p<0.001$) و *** معناداری مقایسه‌ی اتانولی برگ نسبت به عصاره‌ی آبی برگ را در سطح ($p<0.001$) نشان‌می‌دهد.

است ($p<0.01$). درمقایسه‌ی عصاره‌های اتانولی و متانولی نیز عصاره‌ی متانولی برگ دارای OD بیشتری (۰/۷۲۱) نسبت به عصاره‌ی اتانولی برگ (۰/۳۲) بوده-است($p<0.05$). عصاره‌های آبی برگ و گل عدد جذب کوچکتری نسبت سایر عصاره‌ها داشتند، ولی اختلاف معناداری میان عصاره‌های آبی برگ (۰/۰٦۵) و گل (۰/۰٦٤) وجودنداشت ($p>0.05$).

نمودار استاندارد رابطه‌ی دوز- پاسخ محلول‌های سولفات آهن در سمت راست شکل ۲ نشان‌داده‌شده که در آن، هر نقطه معرِّف میانگین عدد جذب سه آزمایش جداگانه می‌باشد. محلول فروس سولفات هپتاهیدرات به-عنوان استاندارد آزمایش FRAP در غلظت‌های ۱۲۵، ۲۵۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰ و ۲۰۰۰ میکروگرم بر لیتر به‌کاربرده‌شد. همانطور که درشکل ۲(راست) دیده‌می‌شود، ضریب همبستگی منحنی کالیبراسیون رابطه‌ی غلظت- پاسخِ فعالیت آنتی‌اکسیدانی فروس سولفات بسیار بالا بود(r^2 =1) که خود، بیانگر رابطه‌ی کاملاً خطی منحنی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن است. علاوه‌براین، در سمت چپ شکلِ۲، ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌های مختلف A. Annua منعکس‌شده‌است. براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، عصاره‌های متانولی و اتانولی برگ و گل A. Annua فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان‌داده‌اند و ترتیب قدرت آنتی‌اکسیدانی این عصاره‌ها به‌صورت (عصاره‌ی آبی برگ و گل <عصاره‌ی اتانولی گل <عصاره‌ی متانولی گل <عصاره‌ی اتانولی برگ <عصاره‌ی متانولی برگ) بوده‌است ولی مقدار TAC عصاره‌های آبی برگ و گل، ناچیز و قابل صرف نظراست ($p>0.05$). یافته‌ها نشان‌می-دهند که عصاره‌ی متانولی برگ A.A از بیشترین مقدار FRAP برخورداراست و مقدار FRAP آن٤/۱۸ ±۷۲/۱۸میکرومول فروس سولفات به‌ازای هر گرم از وزن عصاره‌ی خشک بود. عصاره‌های متانولی گل و اتانولی برگ نیز دارای مقادیر FRAP مناسبی بوده‌اند که این مقدار به‌ترتیب۲/۳۷±۲٤/۷۸ و ۲/۱±۳۲میکرومول فروس سولفات به‌ازای هرگرم از پودرعصاره‌ی خشک بوده‌است،



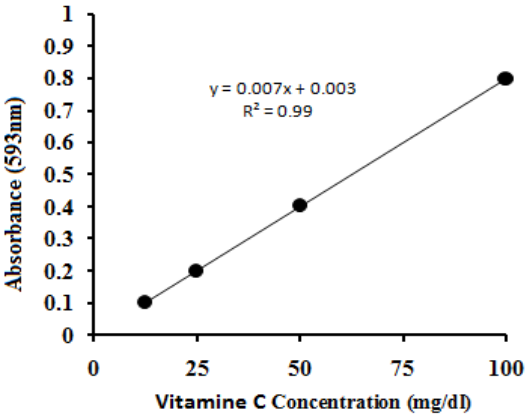


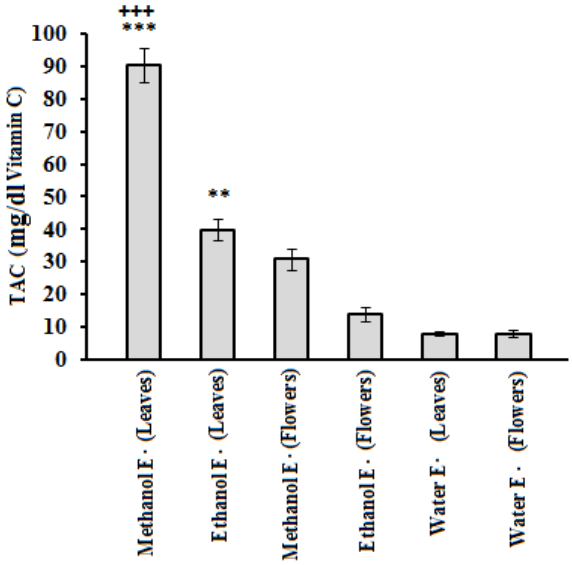
شکل۲، میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل A. Annua (راست) با توجه به‌منحنی استاندارد فروس سولفات هپتاهیدرات (چپ)..E = عصاره. *** معناداری تفاوت ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل عصاره‌ی متانولی برگ و گل را در سطح (p<0.001) ، +++ نیز معناداری مقایسه‌ی عصاره متانولی برگ و عصاره‌ی اتانولی برگ را در سطح (p<0.001) و ** معناداری مقایسه‌ی اتانولی برگ نسبت به عصاره‌ی آبی برگ را در سطح (p<0.01) نشان‌می‌دهد.

درحالی‌که عصاره‌ی اتانولی گل و عصاره‌های آبی برگ و گل مقادیر FRAP بسیار پایینی به‌دست‌داده‌اند که مقدار آن به‌ترتیب ۰/۷۸±۱۱/۳۲،۰/۵۳± ۶/۵۵ و۰/۷۷± ۶/۴۳ میکرومول فروس سولفات به ازای هر گرم از عصاره‌ی خشک بوده است.

نتایج حاصل از فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ی عصاره‌های مختلف برگ و گل A.A نسبت به استاندارد ویتامین C و با واحد mg/dl از اسید اسکوربیک در نمودار ۳ منعکس‌شده‌اند. در نمودار ۳ (سمت چپ) هر نقطه میانگین عدد جذب سه آزمایش جداگانه می‌باشد. ویتامین C به‌عنوان استاندارد آزمایش FRAP دراین مطالعه با دوزهای به‌ترتیب ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم بر دسی لیتر استفاده‌شد و عدد جذب درطول موج ۵۹۳ نانومتر خوانده‌شد. خطی بودن منحنی کالیبراسیون رابطه‌ی غلظت و اثر آنتی‌اکسیدانی با به‌کارگیری غلظت‌های مختلف ویتامین C آزمایش‌شد که در بررسی FRAP انجام شده درمدت ۱۰ دقیقه از انکوبه‌نمودن ضریب همبستگی r^2>0.99 به‌دست‌آمد که از رابطه‌ی خطی خوب منحنی غلظت- پاسخ حکایت‌دارد.

از قسمت راست شکل ۳، می‌توان مشاهده‌نمود که مقدار TAC محاسبه‌شده از بررسی FRAP عصاره‌های مختلف برگ و گل تفاوت‌های زیادی با یکدیگر نشان‌می‌دهند. حداکثر خاصیّت آنتی‌اکسیدانی به‌ترتیب برای عصاره‌ی متانولی برگ (۹۰/۳۱±۵/۲۷)، عصاره‌ی اتانولی برگ (۳۹/۷۷±۳/۲) و عصاره‌ی متانولی گل (۳۰/۶۸±۳/٤) میلی‌گرم ویتامین C درهر دسی‌لیتر برای هر گرم از وزن خشک پودر گیاه به‌دست‌آمد. همانطور که در شکل مربوط دیده‌می‌شود عصاره‌ی اتانولی گل و همچنین عصاره‌های آبی برگ و گل ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی بسیار پایینی نشان داده‌اند و مقدار TAC انها به‌ترتیب ۱۳/۷۵±۲/۱، ۷/۷۵±۰/٦٦ و ۷/٦±۰/۷۳ میلی‌گرم در دسی‌لیتر برای هر گرم از پودر گیاه بوده‌است که در مقایسه با عصاره‌های متانولی برگ و گل و نیز عصاره‌ی اتانولی برگ به‌طور معناداری کمتر بوده‌است. اگرچه قدرت آنتی اکسیدانی تام عصاره‌ی آبی برگ (۷/۷۵±۰/٦٦) و گل (۷/٦±۰/۷۳) تفاوت معناداری با یکدیگر نداشت (p>0.05)، ولی ازنظر مقایسه‌ی عصاره‌های به‌دست‌آمده حداقل خاصیّت آنتی-اکسیدانی برای عصاره‌ی آبی برگ و گل به‌دست‌آمد.





شکل ۳، میانگین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC) عصاره‌های آبی، اتانولی و متانولی برگ و گل A. Annua (راست) براساس منحنی استاندارد ویتامین C (چپ)..E = عصاره. *** معناداری آماری مقایسه عصاره‌ی متانولی برگ و گل در سطح (p<0.001) و +++ معناداری مقایسه‌ی عصاره‌ی متانولی برگ و عصاره‌ی اتانولی برگ را در سطح (p<0.001) نشان‌می‌دهد.

بحث

مطالعه‌ی حاضر، به‌بررسی نقش آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی برگ و گل A.A که به‌طور وسیعی در مناطق مختلف اطراف شهرستان بابل رشد می‌کنند، اختصاص‌یافته‌است. ازمیان عصاره‌های آبی، متانولی و اتانولی برگ و گل A.A و نمونه‌های استاندارد سولفات آهن و ویتامین C که درشرایط خارج بدن برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش FRAP بررسی‌شده‌اند، عصاره‌ی متانولی آن نسبت به سایر عصاره‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی نشان‌داد (p<0.01). در مقایسه‌ی ویژگی آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی متانولی برگ و گل نیز ظرفیّت آنتی‌اکسیدان کل عصاره‌ی متانولی برگ به‌طور معناداری بیشتر از عصاره‌ی گل بوده‌است (p<0.001). نتایج نشان‌می‌دهند که عصاره‌ی اتانولی برگ نیز از ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتری نسبت به عصاره‌ی اتانولی گل برخورداراست (p<0.005). براساس یافته‌های مطالعه‌ی حاضر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ی اتانولی بیشتر از عصاره‌ی آبی بوده، ولی به‌طورکلی، عصاره‌های اتانولی و آبی گل و همچنین عصاره‌ی آبی برگ A.A درمقایسه با نمونه‌های استاندارد اسیدآسکوربیک و سولفات آهن فاقد فعالیّت آنتی‌اکسیدانی معنادارنبوده‌اند (p>0.05). *بنظرمی‌رسد* که ازطریق مقایسه‌ی یافته‌های مربوط به TAC عصاره‌های متانولی برگ و گل می‌توان نتیجه‌گرفت که احتمالاً ترکیبات آنتی‌اکسیدان در برگ‌های A.A بیشتر توزیع‌شده‌اند. گزارش‌شده‌است که محتوای پروتئینی در برگ‌های A. Annua بالاتر است (۹) که این امر، احتمالاًر ویژگی آنتی‌اکسیدانی بیشتری به نمونه‌های عصاره‌ی برگ آن بخشیده‌است.

درمطالعه‌ی حاضر، عصاره‌ی متانولی برگ‌ها ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتری را نشان‌داد که مقدار آن ۹۰/۳۱ و ۷۲/۱۸ بوده‌است. مشابه یافته‌های این مطالعه، نتایج مطالعات مختلف نیز نشان داده‌اند که عصاره‌ی متانولی A. Annua در مقایسه با عصاره‌ی آبی موثرتر بود و به‌ازای هرگرم از نمونه‌ی خشکِ منجمد، مقدار FRAP بالاتری نسبت به عصاره‌ی آبی به‌دست‌داد (۲، ۸ و ۱۶). تفاوت در ظرفیّت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها را می‌توان به اثربخشی حلال‌ها در استخراج موثرتر محتوای آنتی‌اکسیدانی نسبت‌داد و دراین راستا، عوامل متعددی بر ترکیبات استخراج‌شده از گیاهان و در نتیجه فعالیّت آنتی-

اکسیدانی آنها تاثیر می‌گذارند. براساس یافته‌های Moure 2001 کیفیت عصاره‌های طبیعی و اثرات آنتی‌اکسیدانی آنها؛ نه تنها به‌مدت ذخیره‌سازی و نگهداری، منشأ جغرافیایی و زمان به‌عمل‌آوری آنها، بل‌که به محیط و عوامل تکنولوژیکی مورداستفاده در عصاره‌گیری نیز بستگی‌دارد. نوع حلال مورداستفاده نیز یکی از عوامل مهمی‌است که در ایجاد اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی حائز اهمیت است. چراکه عوامل آنتی‌اکسیدان مختلف قطبیّت‌های متفاوتی دارند (۲۵).

درمطالعه‌ی دیگری که برای تعیین اثرات آنتی-اکسیدانی A.A انجام‌شده‌است، در روش‌های ABTS و DPPH عصاره‌ی متانولی برگ‌های A.A نسبت به عصاره-های با حلال‌های آب، اتانول، کلروفرم و هگزان فعالیّت آنتی‌اکسیدانی بیشتری داشت، ولی عصاره‌ی آبی آنتی-اکسیدان قوی‌تری از عصاره‌ی اتانولی بود (۹). طیفی از ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی از جمله فنل‌ها، فلاونوئیدها و ویتامین‌ها در A. Annua گزارش‌شده‌اند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنلی شناخته شده است. چراکه فنل‌ها شلات‌کننده‌های قوی یون‌های فلزی فعال اکسیدکننده هستند و رادیکال‌های آزاد را غیرفعال می-سازند. عصاره‌ی متانولی برگ A. Annua دارای غلظت بالایی از ترکیبات فنلی است و به‌نظرمی‌رسد که مقدار خالص فنل استخراجی به قطبیّت حلال‌های به‌کار رفته، وابسته‌است و حلال‌های با قطبیّت بالا مانند متانول برای استخراج آن مناسب‌ترهستند. البته آب هم ازاین‌جهت، قابل مقایسه با متانول است(۲۶). تاثیر قطبیّت حلال بر نتایج FRAP اخیراً گزارش‌شده‌است (۲۷). درمطالعه‌ی اقبال و همکاران، مقدار FRAP عصاره‌ی متانولی A. Annua ۱۱/۸۲ بوده که این مقدار، کمتر از مقدار FRAP عصاره‌های اتانولی و کلروفرمی آن بیشتربوده‌است (۹). درهمین‌راستا، یافته‌های مطالعه‌ی قادری و همکاران نشان-داد که بازدهی استخراج ترکیبات فنلی و فلاونوییدی در عصاره‌ی اتانولی ۴۹/۱۳٪، در عصاره‌ی متانولی ۴۶/۸۱٪ و عصاره‌ی آبی کمترین بازدهی استخراج (۲۶/۶۷٪) را داشته‌است (۲۸) که این مقادیر اگرچه با فعالیت آنتی-اکسیدانی به‌دست‌آمده از مطالعه‌ی حاضر از جنبه‌ی فعالیّت آنتی‌اکسیدانی پایین عصاره‌ی آبی مطابقت می-نماید، ولی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر عصاره‌ی متانولی متفاوت‌است. اخیراً گزارش‌شده‌است که نتایج یافته‌های FRAP تحت تاثیر قطبیّت حلال‌ها قرارمی‌گیرد (۲۷). بنابراین تاثیر آنتی‌اکسیدانی ناچیز عصاره‌های آبی A. Annua ممکن‌است؛ نه به‌دلیل عدم کفایت استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی آن، بل‌که به‌واسطه‌ی عدم کارآمدی FRAP در تعیین اثر آنتی‌اکسیدان‌های هیدروفیلیک به-دست‌آمده‌باشند.

به‌طورکلی، مطابق یافته‌های حاضر می‌توان نتیجه-گرفت که عصاره‌ی گل‌ها و برگ‌های گیاه A Annua دارای فعالیّت آنتی‌اکسیدانی کل متفاوتی هستند. عصاره-های هیدروالکلی دارای عمل آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی است که میزان آن بسته به نوع حلالی که در عصاره‌گیری استفاده‌شد، تفاوت‌دارد. به‌منظور مطالعه‌ی بیشتر، اندازه-گیری ترکیبات و عناصر فعال موجود در هریک از عصاره‌ها و نیز برگ و گل گیاه مزبورمی‌تواند به درک تاثیر آنتی‌اکسیدانی آنها کمک قابل توجهی‌کند.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله گروه نویسندگان از همکاری صمیمانه‌ی پرسنل آزمایشگاه سپید که درانجام این پژوهش کمال همکاری را داشتند، تشکر و قدردانی‌می-کند.

References

1. Patel Rajesh M, Patel Natvar J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. Journal of Advanced Pharmacy Education & Research,

2011; 1: 52-68.
2. Rabeta MS, Nur Faraniza R. Total phenolic content and ferric reducing antioxidant power of the leaves and fruits of Garcinia atrovirdis and Cynometra cauliflora. International Food Research Journal, 2013; 20(4): 1691-6.
3. 3-Ramamoorthy PK, Bono A. Antioxidant Activity, Total Phenolic and Flavonoid Content of Morinda Citrifolia Fruit Extracts from Various Extraction Processes. Journal of Engineering Science and Technology. 2007, 2 (1): 70-80.
4. Apak R., Gorinstein S, Böhm V, Schaich KM, Özyürek M, Güçlü K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report) Pure Appl. Chem,2013, 85(5): 957–98.
5. Pokorny J. Are natural antioxidants better and safer than synthetic antioxidant components. Europeon Journal of Lipid science and Technology. 2007, 109(6): 629-42.
6. Brisibe EA, Umoren UE, Owai PU, Brisibe F. Dietary inclusion of dried Artemisia annua leaves for management of coccidiosis and growth enhancement in chickens. Afr J Biotechnol.2008; 7 (22): 4083-92.
7. Yoon KD, Chin YW, Yang MH, Kim J. Separation of anti-ulcer flavonoids from Artemisia extracts by high-speed countercurrent chromatography. Food Chem,2011; 129(2): 679-83.
8. Gouveia SC, Castilho PC. Artemisia annua L.: Essential oil and acetone extract composition and antioxidant capacity. Industrial Crops and Products, 2013, 45 : 170-81.
9. Iqbal S, Younas U, Wei Chan K, Zia-Ul-Haq M, Ismail M. Chemical Composition of *Artemisia annua* L. Leaves and Antioxidant Potential of Extracts as a Function of Extraction Solvents. Molecules, 2012, 17(5): 6020-32.
10. Juteau F, Masotti V, Bessie`re JM, Dherbomez M, Viano J. Antibacterial and antioxidant activities of Artemisia annua essential oil. Fitoterapia, 2002; 73: 532-5.
11. Carvalho IS, Cavaco T, Brodelius M. Phenolic composition and antioxidant capacity of six Artemisia species. Ind Crops Prod, 2011;33(2): 382-8.
12. Cavar S, Maksimovic M, Vidic D, Paric A. Chemical composition and antiox-idant and antimicrobial activity of essential oil of Artemisia annua L. from Bosnia. Ind Crops Prod,2012; 37: 479-85.
13. Bora KS, Sharma A. The genus Artemisia: A comprehensive review. Pharm Biol,2011, 49(1): 101-9.
14. Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A. Flavonoids from Artemisia annua L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. Molecules, 2010; 15:3135-70.
15. Jayaprakasha GK, Girennavar B, Patil BS. Antioxidant capacity of pummelo and navel oranges: Extraction efficiency of solvents in sequence. LWT Food Sci Technol, 2008; 41: 376-84.
16. Skowyra M, Gallego MG, Segovia F, Almajano MP. Antioxidant Properties of Artemisia annua Extracts in Model Food Emulsions. Antioxidants, 2014, 3(1):116-28.
17. Benzie IFF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. Anal. Biochem,1996, 239: 70-6.
18. Guo C, Yang J, Wei J, Li Y, Xu J, Jiang Y. Antioxidant activities of peel, pulp, and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. Nutrition Research, 2003; 23 (12): 1719-26.
19. Mahesh B, satish S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. World J Agric Sci, 2008; 4(S): 839-43.
20. Massiha AR, Khoshkholgh Pahlaviani MR, Issazadeh K, Bidarigh S, Zarrabi S. Antibacterial Activity of Essential Oils and Plant Extracts of Artemisia (Artemisia annua L.) In Vitro. ZJRMS, 2013; 15(6): 14-8.
21. Philip Jacob P, Madhumitha G, Mary Saral A. Free radical scavenging and reducing power of Lawsonia inermis L. seeds. Asian Pac J Trop Med, 2011; 4(6):457-61.
22. Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Kim DO, Heo HJ. Neuronal cell protective and ntioxidant effects of phenolics obtained from Zanthoxylum piperitum leaf using in vitro model system. Food Chem, 2011; 125(2): 417-22.
23. Wootton-Beard PC, Moran A, Ryan L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol

content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin Ciocalteu methods. Food Res Int, 2011, 44(1): 217-24.

24. Seng Hong Lim C, Lin Lim S. Ferric Reducing Capacity Versus Ferric Reducing Antioxidant Power for Measuring Total Antioxidant Capacity. Lab Medicine, 2013; 44:51-5.
25. Moure A, Franco D, Sineiro J, Domĭngguez H, Nūňez MJ, Lema JM. Antioxidant activity of extracts from Gevuina avellana and Rosa rubiginosa defatted seeds. Food Research International, 2001, 34(2):103-9.
26. López A, Rico M, Rivero A, de Tangil MS. The effects of solvents on the phenolic contents and antioxidant activity of Stypocaulon scoparium algae extracts. Food Chem, 2011; 125: 1104–9.
27. Perez-Jimenez J, Saura-Calixto F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. Food Res Int, 2006, 39(7):791-800.
28. Ghaderi Ghahfarokhi M, Mamashloo S, Sadeghi Mahoonak AR, Alami M. Evaluation of antioxidant activity, reducing power and free radical scavenging of different extract of Artemisia annua L. Journal on Plant Science Researches,2011; 1(Serial 21): 46-57. [Persian]

Antioxidant activity of different extracts of the Artemisia Annua growing in an area of Babol city

Baradaran M., ph.D
Assistant professor, department of physiology and pharmacology, faculty medicine of Babol University of medical sciences.

Ashrafpour M,. ph.D
Cellular & Molecular Biology Research Center

Rezaei H., MSc
MSc in Plant Sciences, Babol Education and development Organization.

Sefidgar A.A., ph.D
Associate professor, department of Fungology and Parasitology, faculty medicine, Babol University of medical sciences.

Sharifi H., MSc
Instructor in department of English language, faculty medicine of Babol University of medical sciences.

Received:23/04/2014**, Revised:**13/07/2014**, Accepted:**23/07/2014

Cooresponding Author:
Cellular and molecular biology research Centre, Deparment of physiology and pharmacology. Babol Univ Med Sci, Babol, Iran.
E-mail:
mnrashrafpour@yahoo.com

Abstract

Background: Plants are an important source of antioxidants that can help to cell's normal metabolism via preventing accumulation of free radicals and so, prevent developing diseases associated with oxidative stress. Thus, the present study was performed to determine the antioxidant properties of Artemissia Annua extracts (AA).

Methods and materials: at first, Artemisia Annua with a local name as Gandvash identified and then some parts of its leaves and flowers into powder. Extracting was done using water, ethanol and methanol solvent. FRAP assay was performed to determine the antioxidant properties. For this purpose, extract solutions with 20% concentration were added to FRAP solution and after incubation, the optical absorption values was measured. The ferrous sulfate and vitamin C were used as standard solutions.

Results: the Mean total antioxidant capacity (TAC) for methanolic leaves extract was 72.18 ± 4.18 micro mol ferrous sulfate and 90.31 ± 5.27 mg of vitamin C per gram of dry weight, which is considerably higher than other extracts ($p<0.001$) . TAC of Ethanolic extract of leaves and Methanolic extract of flowers ranked lower in terms of significance . There was no significant difference between aqueous extracts of leaves and flowers in TAC ($p>0.05$) while, the ethanol extract of the leaves and flowers were different significantly ($p <0.01$)

Conclusion: Various extracts of A.A showed different TAC values which may result from some differences in efficiency level of solvents used in extracting of plant's antioxidant substances. It seems that the methanol is better solvent in comparison to the ethanol and water for extracting of antioxidant materials.besides, The TAC findings of methanolic extracts of leaves and flowers suggest this is likely that the A.A antioxidant compounds distributed more in the leaves.

Keywords: *Artemisia Annua, antioxidant, total antioxidant capacities, extracting.*